

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich  
(Direktoren: Prof. Dr. med. E. Jenny und  
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle)

---

# **Immunhistochemischer Nachweis von Z-DNS in der Spermatogenese**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von

DANIELA DORITH NAEGELI

Tierärztin  
von Zürich und Marthalen

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle, Referent  
Prof. Dr. med. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1988  
Zentralstelle der Studentenschaft



Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich  
(Direktoren: Prof. Dr. med. E. Jenny und  
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle)

---

# **Immunhistochemischer Nachweis von Z-DNS in der Spermatogenese**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Zürich

vorgelegt von

**DANIELA DORITH NAEGELI**

Tierärztin  
von Zürich und Marthalen

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. med. et phil. II C.C. Kuenzle, Referent  
Prof. Dr. med. E. Jenny, Korreferent

Zürich 1988  
Zentralstelle der Studentenschaft



## Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Kapitel 1: Einleitung</b>                                       | <b>1</b>  |
| Z-DNS                                                              | 1         |
| <b>Kapitel 2: Material</b>                                         | <b>4</b>  |
| Versuchstiere                                                      | 4         |
| Chemische Reagenzien                                               | 4         |
| Immunologische Reagenzien                                          | 5         |
| Pufferlösungen                                                     | 6         |
| Serum                                                              | 6         |
| Antiserum                                                          | 6         |
| Kontrollserum                                                      | 7         |
| <b>Kapitel 3: Methoden</b>                                         | <b>9</b>  |
| Fixation der Gewebe                                                | 9         |
| Fixationsmittel                                                    | 9         |
| Methodik für die Essigsäure- und Methanolfixation                  | 10        |
| Herstellung von histologischen Schnitten                           | 11        |
| Beschichten der Objektträger                                       | 11        |
| Paraffinschnitte                                                   | 11        |
| Absorption des $\alpha$ -Z(47)-Serums mit gelösten Polynukleotiden | 12        |
| Immunhistochemie                                                   | 12        |
| Gegenfärbungen                                                     | 13        |
| <b>Kapitel 4: Resultate</b>                                        | <b>15</b> |
| Optimierung der Methodik                                           | 15        |
| Fixationsmittel                                                    | 16        |
| Absorptionsversuche                                                | 17        |
| Verteilung der Z-DNS im sich entwickelnden Hoden                   | 22        |
| <b>Kapitel 5: Diskussion</b>                                       | <b>30</b> |
| Rekapitulation der eigenen Befunde                                 | 30        |
| Hodenentwicklung und Spermatogenese                                | 31        |
| Zur Entwicklung der Gonaden bei der Ratte                          | 31        |
| Zur Entwicklung der Keimzellen bei der Ratte                       | 32        |
| Mögliche Funktionen von Z-DNS in der Spermatogenese                | 40        |

|                                              |           |
|----------------------------------------------|-----------|
| RNS-Transkription .....                      | 40        |
| DNS-Replikation .....                        | 41        |
| DNS-Rekombination .....                      | 42        |
| <b>Kapitel 6: Zusammenfassung .....</b>      | <b>44</b> |
| <b>Kapitel 7: Literaturverzeichnis .....</b> | <b>45</b> |
| <b>Kapitel 8: Dankesadressen .....</b>       | <b>59</b> |
| <b>Kapitel 9: Lebenslauf .....</b>           | <b>60</b> |

### *Abkürzungen und Erklärungen*

|             |                                                   |
|-------------|---------------------------------------------------|
| BSA         | bovines Serumalbumin                              |
| dA          | Desoxyadenosin                                    |
| dG          | Desoxyguanosin                                    |
| dC          | Desoxycytidin                                     |
| dT          | Desoxythymidin                                    |
| DNS         | Desoxyribonukleinsäure                            |
| RNS         | Ribonukleinsäure                                  |
| IgG         | Immunglobulin G                                   |
| GAR         | Ziegenerum gegen Kaninchen-IgG (goat anti rabbit) |
| PAP-Komplex | Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex                 |
| PBS         | Phosphatgepufferte Salzlösung                     |
| Tris        | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                  |
| EDTA        | Aethylendiamintetraessigsäure                     |
| SP          | Serumpuffer                                       |
| RIA         | Radioimmunoassay                                  |

poly(dG-dC) • poly(dG-dC) Doppelsträngiges Kopolymer aus alternierenden dG- und dC-Einheiten. Bei niedriger Ionenstärke liegt dieses in B-Form, bei hoher Ionenstärke in Z-Form vor.

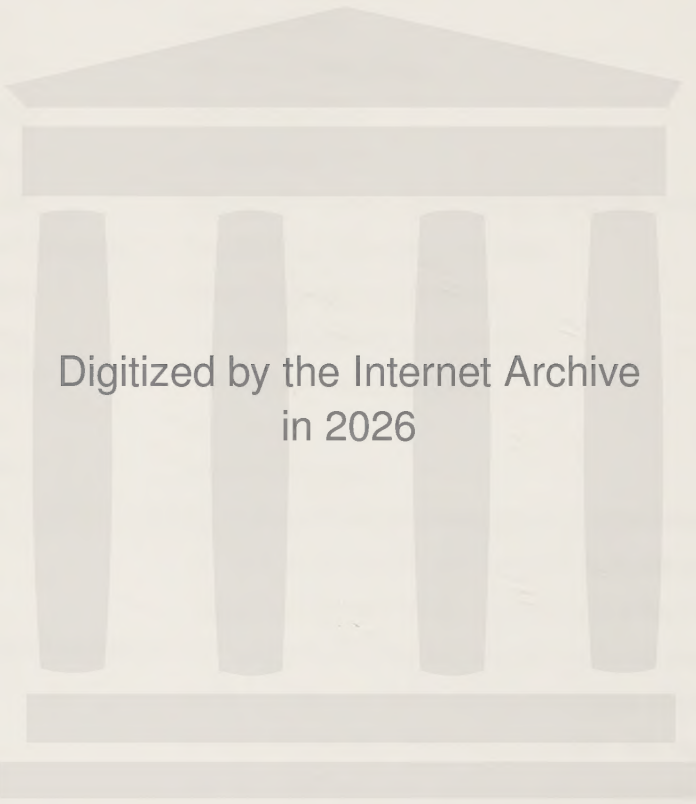
Bromiertes poly(dG-dC) • poly(dG-dC) Doppelsträngiges Kopolymer wie oben, welches statistisch zufällig mit Brom substituiert ist. Die Substitution erfolgt am C8-Atom des Guanins und am C5-Atom des Cytidins. Das Kopolymer liegt durch diese Modifikation auch bei physiologischen Bedingungen in Z-Konformation vor [52].

DAB 3,3'-Diaminobenzidin • 4HCl

In-Spermatogonien intermediäre Spermatogonien

Spermiogenese      Entwicklung der Spermatiden zu reifen Spermien,  
Spermienausreifung

Spermatogenese      ganze Entwicklung der Keimzellen, von  
A-Spermatogonien ausgehend inklusive Spermiogenese



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## Kapitel 1

### EINLEITUNG

#### 1.1 Z-DNS

Z-DNS ist eine doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure, die im Gegensatz zur erstentdeckten, rechtsgewundenen B-DNS linksgewunden ist [74] [14]. Diese Linksdrehung bewirkt, dass das Zucker-Phosphatrückgrat als Zickzacklinie verläuft [73]. Daher der Name "Z-DNS".

Das Auftreten der Z-Konformation ist an verschiedene Voraussetzungen gebunden (vergleiche die Uebersichtsartikel [25] [43] [47] [64])

1. Es müssen alternierende Purin-Pyrimidinsequenzen vorliegen, wobei wenige Unterbrechungen erlaubt sind. Am stabilsten ist ein Polynukleotid aus alternierenden dG- und dC-Einheiten, gefolgt von dC-dA [43] [57]. Aber auch natürliche Sequenzen können in Z-Form gebracht werden. Als synthetisches Polynukleotid wurde am häufigsten poly(dG-dC) • poly(dG-dC) verwendet.
2. Der Uebergang von der B- in die Z-Form wird begünstigt durch superhelikale Ueberwindung (supercoiling) [61] [24], räumlich anspruchsvolle, kovalente Modifikationen (z.B. Bromierung von poly(dG-dC) • poly(dG-dC) und Reaktion mit voluminösen, organischen Platinkomplexen), zweiwertige Kationen (z.B.  $Mg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ) und organische Lösungsmittel.

Z-DNS wurde nach der anfänglich rein physikalischen Entdeckung bald auch in biologischen Strukturen nachgewiesen. Aufgrund immuncytochemischer Untersuchungen wurde Z-DNS in den Polytäanchrosomen von *Drosophila* und *Chironomus* [56] [42] [33] [34], im Makronukleus des Ciliaten *Stylonychia mytilus* [44], in Keimzellen der Ratte [54], und in Metaphasechromosomen von Primaten [72] gefunden. Z-DNS ist relativ stark immunogen und eignet sich zur Erzeugung spezifischer Antikörper in Maus und Kaninchen [37] [38] [45] [46] [51] [57]. Die immuncytochemischen Untersuchungen an den grossen Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila* und *Chironomus* fielen von Anfang an widersprüchlich aus. Hill und Stollar [24] zeigten, dass Intensität und Lokalisation der Immunreaktivität stark vom Ausmass der Essigsäurefixation abhing. Erklärt wurde dieser Befund durch das Herauslösen basischer Proteine aus dem Nukleosom. Dadurch würde in der DNS ein negativer Torsionszwang entstehen, und in dessen Folge ein Uebergang von der B- zur Z-Form.

Aufgrund dieses Befundes warf Hill in einem weiteren Artikel [25] die Frage des Vorkommens von Z-DNS in vivo auf. Trotz Skepsis gegenüber den Forschungsergebnissen vermutete er, dass Transkription und Replikation ein Uebergehen der B- zur Z-Form erleichtern könnten. Darum könnte die Z-Konformation als dynamische Struktur betrachtet werden, die sich in torsionsgedrängtem Chromatin bildet und eventuell eine Funktion in der Regulation der Genexpression übernimmt. Potentiell Z-DNS bildende Sequenzen wurden im Genom des Menschen [18] [72], im Somatostatin- und Prolactingen der Ratte [22] [15], im Protamingen der Regenbogenforelle [1] und in den Genomen verschiedener anderer Eukaryonten [19] [20] [71] nachgewiesen.

Im Jahre 1983 wurde die Dissertation von G. Morgenegg über den immunhistochemischen Nachweis von Z-DNS in Rattengeweben veröffentlicht [54]. In dieser Arbeit wurde das hauptsächliche Vorkommen von Z-DNS-Immunreaktivität im Keimepithel des Hodens beschrieben. In der Spermatogenese finden meiotische Rekombinationen statt (siehe dazu die ausführliche Darstellung der Spermatogenese in Kapitel 5). Der mögliche Zusammenhang zwischen Rekombination und Z-DNS liess deshalb vermuten, dass das Auftreten von Z-DNS im Hoden mit diesem Vorgang zusammenhängen könnte. Deswegen erhielt ich den Auftrag, eine detailliertere Studie über die Z-DNS-Immunreaktivität des Rattenhodens während der Entwicklung durchzuführen mit dem Ziel, die genauen Zellstadien zu bestimmen, in welchen Z-DNS-Immunreaktivität auftritt.



## Kapitel 2

### MATERIAL

#### 2.1 Versuchstiere

Es wurden weissen Ratten des Stamms Zur:SIVZ verwendet. Die Tiere wurden vom Institut für Zuchthygiene der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich geliefert.

#### 2.2 Chemische Reagenzien

|                                           |                                   |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|
| Ammoniumchromat                           | Merck 1151                        |
| Benzol                                    | Merck 1783                        |
| BSA                                       | Fluka 05480                       |
| EDTA (Titriplex)                          | Merck 8418                        |
| Eisessig                                  | Merck 63                          |
| Eukitt                                    | Kindler AG (Freiburg BRD)         |
| Gelatina alba                             | Kantonsapotheke Zürich            |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Perhydrol) | Merck 7209                        |
| Methylbenzoat                             | Fluka 12460                       |
| Paraplast®Plus                            | Monoject Scientific Inc. (Irland) |
| Poly(dG-dC) • poly(dG-dC)                 | P-L Biochemicals Inc.             |

Bromiertes poly(dG-dC) • poly(dG-dC) Dr. R.Hobi, dieses Labor

Tris Fluka 93349

Toluol Kantonsapotheke Zürich

Tween 20 Merck 822184

Xylol Kantonsapotheke Zürich

## **2.3 Immunologische Reagenzien**

GAR -bis 31.12.86 Nordic (Tilburg NL) 1:50 in PBS  
-ab 1.1.87 von BioMakor (Kiriath Weizmann,  
Rehovot, Israel. Vertretung CH:  
Bühlmann Laboratories AG, Basel)  
1:300 in 0.1 M Tris

PAP-Komplex vom Kaninchen Sternberger & Meyer (Jarrettsville, Maryland,  
USA) 1:200 in SP

DAB Polysciences (Warrington, Pennsylvania, USA  
Vertretung CH: Chemie Brunschwig AG,  
Basel)

Ziegenserum Zwergziege \*11.3.86 männl. kastr. Nr.6 grün,  
Institut für Pharmakologie und Biochemie  
Zürich

## **2.4 Pufferlösungen**

|                           |                          |
|---------------------------|--------------------------|
| PBS pH 7,4                | 137 mM NaCl              |
|                           | 3 mM KCl                 |
|                           | 10 mM Na/K-Phosphat      |
| Serumpuffer pH 7,4        | 150 mM NaCl              |
|                           | 1mM EDTA                 |
|                           | 50 mM Tris-HCl           |
|                           | 0,1 % (Gew/Vol) BSA      |
|                           | 0,5 % (Vol/Vol) Tween 20 |
| 0,1 M Tris-Puffer pH 7,4  | 139 mM NaCl              |
|                           | 100 mM Tris-HCl          |
| 0,05 M Tris-Puffer pH 7,6 | 139 mM NaCl              |
|                           | 50 mM Tris-HCl           |
| Absorptionspuffer pH 7,5  | 150 mM NaCl              |
|                           | 1 mM $MgCl_2$            |
|                           | 50 mM Tris-HCl           |

## **2.5 Seren**

### **2.5.1 Antiseren**

Für die Versuche wurden zwei Anti-Z-DNS-Seren aus Kaninchen verwendet. Sie tragen die Bezeichnung B13 und  $\alpha$ -Z(47). B13 erhielt ich von Dr. Marc Leng, CNRS Orléans. Es wurde durch Immunisieren mit poly(dG-dC) • poly(dG-dC)dienPt(0,12) gewonnen und erwies sich im RIA als hochspezifisch für Z-DNS [45], [46]. Die Konzentration Z-DNS-spezifischer IgG betrug 0,27 mg/ml.

$\alpha$ -Z(47) erhielt ich von Dr. G.Morgenegg, dieses Labor. Es wurde durch Immunisieren mit bromiertem poly(dG-dC) • poly(dG-dC) erzeugt [52]. Die Charakterisierung übernahm Marc Leng, CNRS Orléans, mit Hilfe eines kompetitiven RIA in 0,2 M NaCl,  $5 \times 10^{-3}$  M Tris-HCl Puffer, pH 7,5 [46]. Die Resultate sind in Abb 1A und 1B dargestellt. Als Tracer diente [ $^3\text{H}$ ]poly(dG-Br $^5$ dC) • poly(dG-Br $^5$ dC) in einer Konzentration von  $3 \times 10^{-7}$  M. Zuerst wurde der optimale Bereich der Serumverdünnung ermittelt, bei der 50 % des Tracers präzipitiert wurden. Abb. 1A zeigt, dass dies bei einer Verdünnung von 1:4000 der Fall war. Anschliessend wurde der kompetitive RIA durchgeführt. Zur Konkurrenz wurden verschiedene Polynukleotide in Z- und B-Form verwendet (siehe Abb. 1B). Die Verdrängung des Tracers erfolgte durch alle 4 angebotenen Formen von Z-DNS, nicht jedoch durch die 2 Formen von B-DNS. Diese Resultate beweisen, dass  $\alpha$ -Z(47) Z-DNS spezifisch erkennt.

### 2.5.2 Kontrollseren

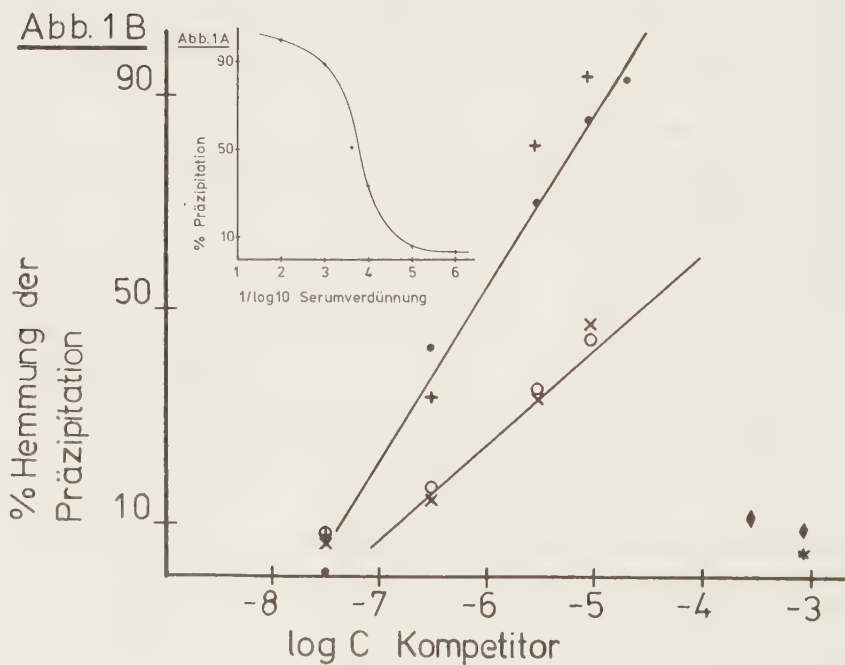
Als Kontrollseren wurden die Präimmunseren PIS 192 (zu B13) und PIS 47 (zu  $\alpha$ -Z(47)) verwendet.

**Abbildung 1: Kompetitiver Radioimmunoassay von  $\alpha$ -Z(47)**

**Abb. 1A:** Präzipitation von  $[^3\text{H}]\text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC})$  ( $3 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) mit  $\alpha$ -Z(47) in Abhängigkeit der Serumverdünnung

**Abb. 1B:** Hemmung der Bindung von  $\alpha$ -Z(47) an  $[^3\text{H}]\text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC})$  durch verschiedene Kompetitoren

in Z-Form:  $\text{polyBr}(\text{dG}-\text{dC}) \cdot \text{polyBr}(\text{dG}-\text{dC})$  (•),  
 $\text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dG}-\text{Br}^5\text{dC})$  (+),  
 $\text{poly}(\text{dGm}^5\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dGm}^5\text{dC})$  (◊),  
 $\text{poly}(\text{dG}-\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dG}-\text{dC})\text{dienPt}$  (x),  
 in B-Form:  $\text{poly}(\text{dG}-\text{dC}) \cdot \text{poly}(\text{dG}-\text{dC})$  (\*),  
 Kalbsthymus-DNA (♦)



## **Kapitel 3**

### **METHODEN**

#### **3.1    *Fixation der Gewebe***

##### **3.1.1    Fixationsmittel**

a) Essigsäure

45 % (Vol/Vol) Eisessig in destilliertem Wasser

b) Methanol

50 % (Vol/Vol) Methanol in destilliertem Wasser

c) Gefriersubstitution mit Aceton

Sofort nach der Dekapitation des Tieres wurden die Hoden entnommen und durch Eintauchen in Isopentan, das mit flüssigem Stickstoff gekühlt worden war, schockgefroren. Danach wurden die Gewebe eine Woche bei -70°C in Aceton eingelegt. Die Flüssigkeit wurde durch ein Gemisch von Aceton : 40 % Formalin : Eisessig : destilliertes Wasser im Verhältnis 90 : 5 : 1 : 4 (Vol) ersetzt und das Gewebe eine weitere Woche darin (-70°C) belassen. Zuletzt wurde bei -20°C dehydriert (siehe 3.1.2.), ab Toluol auf Raumtemperatur aufgewärmt und eingebettet wie in 3.1.2. beschrieben.

### **3.1.2 Methodik für die Essigsäure- und Methanolfixation**

Da der Rattenhoden einen sehr hohen Innendruck und wenig zusammenhaltendes Stützgewebe aufweist, quillt durch das Zerschneiden das Gewebe hervor und verliert die ursprüngliche Textur. Deshalb wurden die Hoden nach der Entnahme als Ganzes belassen. Sie wurden je nach Grösse verschieden lange in das Fixationsmittel gelegt, welches entweder eiskühlt war oder Raumtemperatur aufwies. Es wurde während der Fixation einmal gewechselt. Für 17-tägige ganze Foeten und Hoden 2-tägiger Tiere wurde 8 Stunden, beziehungsweise 1 Stunde bei 4°C fixiert. Um optimale Resultate bei den Hoden älterer Tiere zu erhalten, mussten verschiedene Fixationszeiten und -temperaturen für jede Altersstufe erprobt werden. Die optimalen Fixationszeiten betrugen 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) für Hoden 7-tägiger Tiere, 4 Stunden (RT) für Hoden 14-tägiger Tiere, ungefähr 12 Stunden (RT) für Hoden 21-tägiger Tiere und 16-18 Stunden (RT) für Hoden 29-tägiger Tiere. Danach dehydrierte man die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Aethanol) je zweimal eine Stunde und legte sie in Toluol (zweimal 1/2 - 2 Stunden) oder Methylbenzoat [8]. Nach dem ersten Aufenthalt in Methylbenzoat (über Nacht) wurden die Stücke solange in einer neuen Methylbenzoatlösung belassen, bis sie auf den Grund des Gefässes sanken. Im folgenden wurden sie in Benzol je nach Grösse bis eine Stunde und in Benzol-Paraffin (1:1) eine Stunde eingelegt. Nach diesem Schritt wurden Toluol- und Methylbenzoat-behandelte Gewebe wieder gleich weiterverarbeitet. Sie wurden je zwei Stunden in einem ersten und zweiten flüssigen Paraffin-Bad belassen. Ungefähr 12 Stunden verblieben die Stücke in einem dritten Paraffin-Bad, wonach man sie in Paraplast einbettete und die Blöcke in fliessendem Wasser abkühlte.

## **3.2 Herstellung von histologischen Schnitten**

### **3.2.1 Beschichten der Objektträger**

Um das Abschwimmen der Schnitte während der Inkubation und den Waschschritten zu verhindern, wurden die Objektträger mit Aether-Alkohol entfettet und mit Chromalaungelatine beschichtet. Die Beschichtungslösung setzte sich aus 0,075 % (Gew/Vol) Ammoniumchromat und 0,75 % (Gew/Vol) Gelatina alba zusammen. Diese Komponenten wurden unter leichtem Erwärmen in destilliertem Wasser gelöst. Die Objektträger wurden einige Male darin geschwenkt, dann liess man die Lösung sorgfältig abtropfen. Nach dem Trocknen bei 37°C wurden sie staubfrei bis zum Gebrauch gelagert.

### **3.2.2 Paraffinschnitte**

Die Paraffinblöcke wurden bei 4°C vorgekühlt. Zum Schneiden von 5 µm-Schnitten verwendete ich ein Mikrotom der Firma R. Jung AG, Heidelberg. Die Schnitte wurden in ein 37-40°C warmes Wasserbad, dem ein wenig Gelatine beigelegt war, gelegt und dann aufgezogen. Das Wasser unter den Schnitten wurde mit einem Tüchlein weggesaugt und die Objektträger kurze Zeit auf einen Strecktisch (ungefähr 50°C) gelegt. Ueber Nacht wurden die Präparate in einen Brutschrank bei 30°C verbracht. Bei Anzeichen von schlecht haftenden Schnitten (weisslich scheinendes Gewebe) belies ich die Objektträger nochmals 12-24 Stunden im Brutschrank, stellte aber ein Glas Wasser dazu und erhöhte die Temperatur leicht. Danach wurde der Paraplast während zwei Stunden bei 60°C geschmolzen. Zum Schluss wurden die Präparate in Kartons gelegt und bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **3.3 Absorption des $\alpha$ -Z(47)-Serums mit gelösten Polynukleotiden**

In Anlehnung an das Vorgehen von G. Morgenegg [54] wurde mit niedrigen Serumkonzentrationen gearbeitet. Die Absorption erfolgte mit bromiertem poly(dG-dC) • poly(dG-dC) als Z-DNS und poly(dG-dC) • poly(dG-dC) als B-DNS. Da der Gehalt des Serums an spezifischen Antikörpern unbekannt war, wurde in Polyallomerröhrchen mit dem Polynukleotid eine Verdünnungsreihe hergestellt, so dass schliesslich 1667, 1000, 600, 225 und 0 ng Polynukleotid in 5 ml Tris- oder Absorptionspuffer vorlagen. Dazu wurden je 5 bis 10  $\mu$ l des  $\alpha$ -Z(47)-Serums gegeben und 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Mit einer Beckman Ultrazentrifuge wurden die Immunkomplexe mit 105'000xg (Rotor SW 50.1, 33'500 rpm) 30 Minuten abzentrifugiert. Der Ueberstand wurde abpipettiert und direkt für die Immunhistochemie verwendet. Die Serumverdünnung betrug in diesem Fall 1:500 oder 1:1000. In einem weiteren Versuch wurde zusätzlich bis auf 1:2000 weiterverdünnt.

### **3.4 Immunhistochemie**

Nach Optimierung eines Grundschemas (siehe Kapitel "Optimierung der Methodik") wurde folgendes Verfahren angewendet: Die Paraffinschnitte wurden 2 x 10 Minuten in Xylol entparaffiniert, durch die Alkoholreihe gezogen (100 %, 96 %, 80 %, 70 % je 2 x 3 Minuten) und 2 x 5 Minuten in Puffer (PBS oder 0,1 M Tris) in einem Gefäss gebadet, worin ein Rührer die Flüssigkeit bewegte. Nach sorgfältigem Trocknen der Bereiche ausserhalb der Gewebeschnitte wurden mit einem Paraplaststift rechteckige Grenzen um die Gewebestücke gezogen, um das Ineinanderfliessen der später aufzubringen-

den Antiserumverdünnungen zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten. Sodann wurden die Schnitte mit 0,1 M Tris-Puffer, dem 10 % Ziegenserum beigegeben worden war, 10 Minuten bei 37°C präinkubiert. Nach Abschütten und kurzem Tauchen in Pufferlösung tropfte man das Anti-Z-DNS-Serum in verschiedenen Verdünnungen auf die Schnitte. Es wurde einen Tag bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem Waschgang von 2 x 5 Minuten Dauer in obigem Puffer (immer mit Rührer) wurden die Schnitte 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Ziegenserum gegen Kaninchen-IgG (GAR in 0,1 M Tris, 1:300) versetzt. Nach dem Abschütten wurde wieder gewaschen und der PAP-Komplex vom Kaninchen (1:200 in SP mit 10 % Ziegenserum) aufgeträufelt. Inkubation 60 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschgang wurde die gebundene Peroxidase durch Entwicklung mit 3,3'-Diaminobenzidin • 4HCl (2 mg) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 µl) in 0,05 M Tris-Puffer (10 ml) sichtbar gemacht. Nach ungefähr 10 Minuten wurde die Reaktion mit einem Pufferbad gestoppt. Nach einem letzten Waschgang wurden einzelne Objektträger in eine Methylenblaulösung verbracht (siehe Kapitel 3.5.) und danach alle Präparate mit Alkohol und Xylol gegenläufig zur Entparaffinierung dehydriert und mit Eukitt zugedeckt. Der braune, unlösliche Niederschlag wurde im Lichtmikroskop lokalisiert und registriert.

### **3.5 Gegenfärbungen**

Für die Histologie wurde die übliche Hämalaun-Eosin-Färbung angewendet [8]. Um eine Kontrolle über die nichtgefärbten Zellkerne der immunhistochemisch behandelten Schnitte zu erhalten, wurde in verschiedenen Versuchen

nach dem letzten Waschschrift mit Methylenblau (125 mg/100 ml PBS) gegengefärbt [8] [48]. Methylenblau ist ein Farbstoff, der mit negativ geladenen Kernstrukturen reagiert und somit viele, von Z-DNS-Antikörpern unbesetzte, Strukturen des Zellkerns anfärbt. Dadurch wurde das Ansprechen der einzelnen Zellen erleichtert. Die so behandelten Zellkerne erschienen hellblau, wenn die Z-DNS-Reaktion negativ war; bei positiver Reaktion waren sie braunblau bis braun.

## Kapitel 4

### RESULTATE

#### 4.1 *Optimierung der Methodik*

Die Versuche erstreckten sich, mit Unterbrüchen, über drei Jahre. Während dieser Zeit wurde das immunhistochemische Vorgehen leicht geändert und neuen Erkenntnissen und immunologischen Reagenzien angepasst.

1. In der Anfangsphase wurde zum Lösen der Antikörper PBS pH 7,4, später 0,1 M Tris pH 7,4 verwendet.
2. B13 wurde bald durch das eigene  $\alpha$ -Z(47)-Serum ersetzt, welches zuerst ausgetestet werden musste. Die optimale Verdünnung lag bei 1:2000 für  $\alpha$ -Z(47) und bei 1:4000 für B13.
3. Das grösste Problem in den Versuchen war nicht das Fehlen einer Immunreaktion, sondern das Vorhandensein von zuviel unspezifischer Färbung (hoher "background"). Deshalb unterzog man die Schnitte einer Präinkubation mit 10 % Ziegen Serum in 0,1 M Tris-Puffer, 10 Minuten bei 37°C [48]. Auch dem PAP-Komplex wurde 10 % Ziegen Serum beigegeben. Durch dieses Vorgehen reduzierte sich die unspezifische Färbung deutlich.
4. Das Waschen vollzog sich zuerst in Plastikgefässen, worin die Schnitte nur wenig bewegt wurden. Später wurden die Objektträgerhalter in ein grosses Glasgefäss gehängt, worin der Puffer mit einem Magneten gerührt wurde [48]. Die totale Waschzeit wurde beibehalten. Es musste

aber stärker auf eine optimale Haftung der Schnitte auf den Objektträgern geachtet werden.

5. Zur Senkung unspezifischer Bindungen wurde schliesslich nur noch 24 statt 72 Stunden inkubiert. Die spezifische Immunreaktion war nach wie vor deutlich.
6. Der Wechsel des Ziegenserums gegen Kaninchen-IgG (GAR) von Nordic auf jenes von BioMakor machte eine Erhöhung der Verdünnung von 1:50 auf 1:300 nötig. Die Immunreaktion konnte sogar mit der Verdünnung 1:600 noch sehr gut nachgewiesen werden. Die Inkubationszeit wurde von 30 auf 60 Minuten erhöht.
7. Es wurden noch Versuche mit einer Zugabe von 1 % Ziegenserum zum Anti-Z-DNS-Serum gemacht. Bei einer Präinkubation mit 10 % Serum und nur kurzem Tauchen in Pufferlösung vor dem Aufträufeln des Antikörpers wurden keine Unterschiede zwischen 0 % und 1 % Ziegenserum in der Antikörperlösung festgestellt.

## **4.2 Fixationsmittel**

Alle angewendeten Fixationsverfahren erbrachten positive Resultate (vergleiche Dissertation von G. Morgenegg, [54]). Das Ausmass der Färbung und vor allem die Gewebserhaltung variierten sehr stark. Als bestes Fixationsmittel erwies sich auch im vorliegenden Versuch 45 % Essigsäure. Hiermit wurde eine sehr gut zu differenzierende Immunfärbung und eine gute Gewebserhaltung erzielt. Mit Methanol fixiert, reagierten die Zellkerne auch stark positiv, wegen der sehr schlechten Gewebserhaltung war aber keine genauere Differenzierung der Zellen möglich. Die Gefriersubstitution erbrach-

te ebenfalls positive Kerne, aber auch hier liess die Gewebemorphologie zu wünschen übrig.

Es stellte sich heraus, dass die Ausbildung von Immunkomplexen stark von der Fixationszeit abhängig war. Wenn mit Essigsäure zu kurz fixiert wurde, konnten nur in myoiden Zellen, interstitiellen mesenchymalen Zellen und in Makrophagen PAP-Komplexe festgestellt werden, die Zellen der Keimbahn färbten kaum.

Ausser durch das Fixationsmittel und die Fixierungszeit wurden die Resultate stark vom Alter der Gewebeschnitte und Paraffinblöcke beeinflusst. Gewebe, die älter als 2-3 Jahre waren, erzeugten nur noch sehr geringe Immunantworten.

### **4.3    *Absorptionsversuche***

Für die Absorptionsversuche wurden nur optimal essigsäurefixierte Hoden verwendet. Die Versuche wurden mit zwei verschiedenen Seren durchgeführt ( $\alpha$ -Z(47) und B13). Sie ergaben lichtmikroskopisch die gleichen Resultate. Die Absorptionsversuche zeigten, dass beide Seren ihre Immunreaktivität verloren, wenn man sie mit dem Polynukleotid in Z-Form inkubierte, nicht jedoch wenn die B-Form angeboten wurde (Abb 2 a - e).

Da der spezifische Antikörpergehalt des  $\alpha$ -Z(47)-Serums unbekannt war, wurde eine Absorptionsreihe erstellt. In einer ersten Anordnung wurden 1000 ng, 600 ng und 225 ng Polynukleotid mit 10  $\mu$ l Serum bei einer Verdünnung von 1:500 versetzt. Die immunhistochemischen Resultate ergaben, dass die Antikörper von 1000 und 600 ng Polynukleotid vollständig absorbiert wurden,

von 225 ng nur teilweise. In einem weiteren Versuch wurden 1667 und 1000 ng Polynukleotid mit 5 µl Serum bei einer Verdünnung von 1:1000 angesetzt. Hierbei wurde jedesmal eine vollständige Absorption erreicht.

*Abbildung 2 a - e:*

Immunhistochemischer Nachweis von Z-DNS im Rattenhoden nach Absorption des Antiserums  $\alpha$ -Z(47) mit poly(dG-dC) • poly(dG-dC) = B-DNS, und bromiertem poly(dG-dC) • poly(dG-dC) = Z-DNS.

Die Bilder stellen Serienschritte dar, in denen jeweils der gleiche Ausschnitt fotografiert wurde. Für die Kolonnen a - e gilt:

obere Reihe:  $\alpha$ -Z(47) 1:1000 ohne Polynukleotid

mittlere Reihe:  $\alpha$ -Z(47) 1:1000 absorbiert mit 1000 ng B-DNS

untere Reihe:  $\alpha$ -Z(47) 1:1000 absorbiert mit 1000 ng Z-DNS

Kolonne 2a: 7-tägiges Tier (Vergrößerung x 220)

Kolonne 2b: 14-tägiges Tier (x 220).

Kolonne 2c: 21-tägiges Tier (x 220)

Kolonne 2d: 29-tägiges Tier (x 220)

Kolonne 2e: 80-tägiges Tier (x 200)

Der Absorptionsversuch mit dem B13-Serum ergab gleiche Resultate.

Abbildung 2a

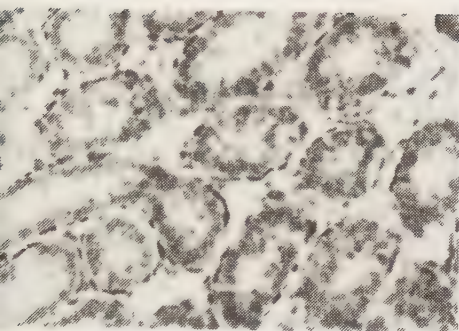


Abbildung 2b

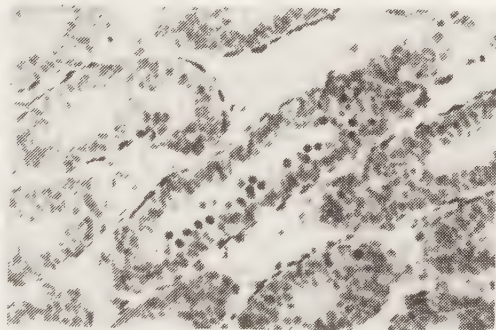
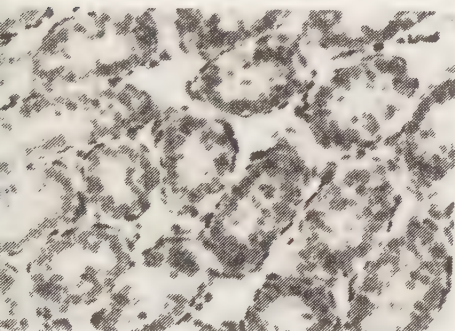
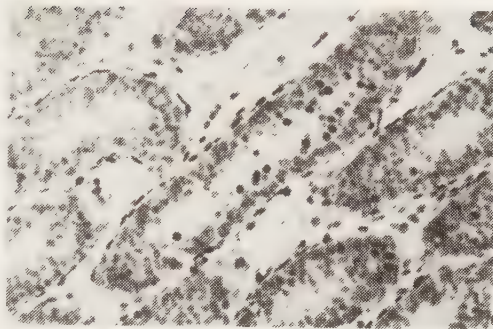


Abbildung 2c

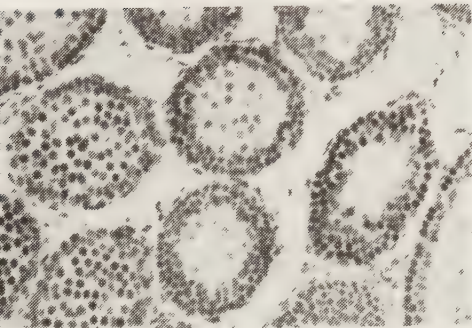


Abbildung 2d

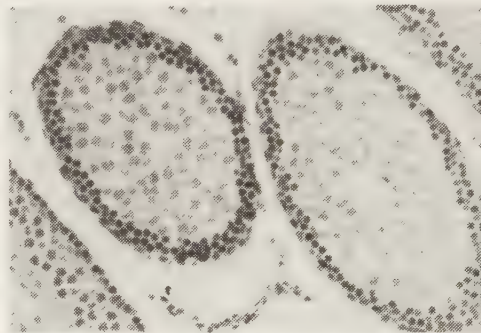
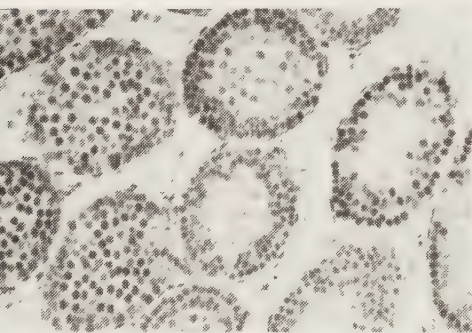
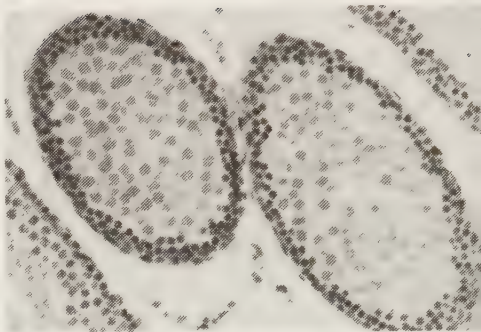


Abbildung 2e



#### **4.4     *Verteilung der Z-DNS im sich entwickelnden Hoden***

Es wurden Hoden von Tieren verschiedenen Alters untersucht. Die Reihe umfasste 17 Tage alte Foeten, 2, 7, 14, 21 und 29 Tage alte Jungratten und ein 80-tägiges Tier. Der Hoden einer 300 Tage alten Ratte wurde von G. Morgenegg schon früher verwendet und diente als Kontrolle.

Die Schnitte wurden wie in 3.4. beschrieben inkubiert. Das  $\alpha$ -Z(47)-Serum wurde in Verdünnungen von 1:500, 1:1000 und 1:2000 aufgetragen. Die Resultate wurden anhand zahlreicher Gewebsschnitte erhoben. Die besten Bewertungen waren an den mit Methylenblau gegengefärbten Schnitten möglich. Methylenblau ist ein Farbstoff, der mit negativ geladenen Kernstrukturen reagiert. Dadurch wurde das Ansprechen der einzelnen Zellen erleichtert. Die PAP-Komplexe färbten ausschliesslich im Zellkern, so dass bei Zellstadiumsbezeichnungen die Ausführung "im Kern" nicht immer explizit angeführt ist.

#### ***Zusammenfassung der immunhistochemischen Resultate***

*(siehe auch die ausführliche Beschreibung der Spermatogenese in Kapitel 5.2.2.)*

Es bestand eine deutliche Altersabhängigkeit der Z-DNS-Immunreaktivität. Diese zeigte sich unter anderem darin, dass in den jungen Ratten diejenigen Zellen, die nicht der Keimbahn angehörten, viel stärker färbten als beim präadulten und adulten Tier. So konnte man im Hoden 7-tägiger Tiere kaum einen Färbeunterschied zwischen den Spermatogonien und den Sertolizellen sehen, die myoiden Zellen und interstitiellen mesenchymalen Zellen waren stark positiv. Einzig die Prospermatogonien waren deutlich negativ. Beim 14 Tage alten Tier dominierten einzelne zentrale pachytäne Spermatozyten, die

später vor dem Diplotän degenerieren, die myoiden Zellen und die interstitiellen mesenchymalen Zellen. Die restlichen Zellkerne erschienen uniform leicht positiv. Das 21-tägige Tier liess schon grössere Unterschiede in der Färbeintensität zwischen Spermatogonien, Spermatozyten und Sertolizellen erkennen. Die myoiden Zellen standen nicht mehr an der Spitze der Positivität, dafür leptotäne und zygotäne Spermatozyten, sowie B-Spermatogonien. Dann folgten A- und In-Spermatogonien. Die älteren pachytänen Spermatozyten färbten nur schwach. Das 29-tägige Tier unterschied sich vom adulten nur dadurch, dass die pachytänen Spermatozyten bis zum Tubulusstadium V-VII (siehe Kapitel 5.2.) deutliche Braunfärbung zeigten. Im adulten Tier (80 Tage alt) konnten die PAP-Komplexe nur bis zum Tubulusstadium II nachgewiesen werden. Den beiden letzten Altersstufen gemeinsam war die Färbung von A-, In- und B-Spermatogonien in der Interphase und von präleptotänen bis frühpachytänen Spermatozyten.

Die Sertolizellfärbung, die beim 7, 14 und 21 Tage alten Tier gut nachweisbar war, schwächte sich beim 29-tägigen Tier ab und fehlte beim 80 Tage alten Tier. Myoide Zellen und interstitielle mesenchymale Zellen färbten sich durchwegs an bis zum adulten Tier, dort aber weniger regelmässig.

## *Die Z-Reaktion in den einzelnen Altersstufen*

### *Foeten*

Eine spezifische Immunreaktion gegen Z-DNS in den Keimzellen der 17-tägigen Foeten liess sich nicht nachweisen.

### *2 Tage alte Tiere*

Da nach dem 17. Tag post conceptionem vor allem die Stützzellen proliferieren und die Prospermatogonien bis zum 4. Tag post partum ruhen, sind in diesem Zeitabschnitt keine Veränderungen zu erwarten. Die Keimzellen zeigten keine Z-DNS-Immunreaktivität.

### *7 Tage alte Tiere*

Man erwartet zu diesem Zeitpunkt schon die ersten A-, In- und B-Spermatogonien, aber auch noch Prospermatogonien. Zudem sind Mitosen der Stützzellen häufig. Die Prospermatogonien waren negativ, die weiteren Teilungsstadien erschienen gleich stark positiv wie die Stützzellen. Herausstechend färbten alle myoiden Zellen und interstitiellen mesenchymalen Zellen (siehe hierzu Abbildung 2a, oberes Bild).

### *14 Tage alte Tiere*

In diesem Stadium findet man, vom ersten Teilungsschub herrührend, wenige präleptotäne bis frühpachytäne Spermatozyten I, die aber bald degenerieren. Ein neuer Teilungsschub von Spermatogonien beginnt spätestens am 15. Tag. Die Sertolizellen haben ihre sprunghafte Vermehrung eingestellt. Die präleptotänen bis frühpachytänen Spermatozyten in der Mitte der Tubuli waren stark positiv. Gleichstark färbten sich die myoiden Zellen an. Auch interstitielle mesenchymale Zellen waren positiv. B-Spermatogonien, Sertoli-

zellen, In- und A-Spermatogonien waren in abnehmender Reihenfolge positiv (siehe hierzu Abbildung 2b, oberes Bild).

### *21 Tage alte Tiere*

Mit individuellen Schwankungen treten ab dem 23. Tag die ersten diplotänen Spermatozyten I, darauffolgend Spermatozyten II und jüngste Spermatiden auf. Sie stammen vom Differenzierungsschub, der um den 15.-18. Tag mit A-Teilungen begonnen und in kürzerer Zeit als beim adulten Tier die Prophasestadien durchlaufen hat. Mit ungefähr 26 Tagen verläuft die Spermatogenese dann wie beim adulten Tier. Somit sind im Hoden 21-tägiger Tiere neben den Spermatogonien zusätzlich Spermatozyten in allen Phasen der langen meiotischen Prophase (ausser Diplotänstadien) zu finden. Leptotäne, zygotäne und frühpachytäne Spermatozyten bis etwa Tubulusstadium VI standen an der Spitze der Färbeintensität, gefolgt von B-Spermatogonien. A- und In-Spermatogonien waren schwächer positiv, alle Zellen in Mitose waren negativ. Myoide und interstitielle mesenchymale Zellen zeigten eine Immunreaktion, Sertolizellen waren im Hoden 21-tägiger Tiere noch deutlich braun (siehe hierzu Abbildung 2c, oberes Bild).

### *29 Tage alte Tiere*

Das mikroskopische Bild wurde zusehends komplexer. Es begann sich das ungefähre Verteilungsmuster des Z-DNS-Vorkommens des adulten Tieres abzuzeichnen. *A-Spermatogonien:* In den meisten Tubulusanschnitten fanden sich einzelne flächig positive A-Zellkerne; kurz vor und während der Mitosen liess sich aber keine Z-DNS nachweisen. *In-Spermatogonien:* Sie zeigten nur in der Interphase Immunkomplexe; kurz vor und während der Mitose waren sie negativ. *B-Spermatogonien:* Sie zeigten positive Zellkerne

in der Interphase. Gegen die Zellteilung zu nahm die PAP-Färbung ab und die mit Methylenblau gefärbten Granula nahmen zu. *Spermatozyten I*: Nach der Teilung der B-Spermatogonien entstehen kleine, runde, präleptotäne Spermatozyten. Diese ähneln anfangs stark B-Spermatogonien. Auch sie enthielten Methylenblau-gefärbte feine Granula neben einem zuerst diskreten, später stärkeren DAB-Niederschlag. Im Leptotän und Zygotän färbten sich die bouquetartigen Chromosomen stark an, das Pachytän war nur bis etwa Stadium VI (V-VII) deutlich positiv. Bis zum Diplotän waren die Chromosomen als ein feines Netzwerk sichtbar, das aber keine deutliche Immunreaktion mehr zeigte. Vom Leptotän bis ins frühe Pachytän schien nur ein Teil des Kerninhaltes von Z-DNS-Antikörpern besetzt zu werden, da bei der Gegenfärbung mit Methylenblau die Zellkerne dunkler und die Chromosomen blaubraun gesprenkelt erschienen. *Spermatozyten II und Spermatiden*: Es liess sich in diesen Zellen keine Z-DNS nachweisen. *Myoide Zellen und interstitielle mesenchymale Zellen*: Sie zeigten durchwegs eine mässige Immunreaktion. *Sertolizellen*: Diese erschienen noch schwach positiv (siehe hierzu Abbildung 2d, oberes Bild).

### *80 Tage altes Tier*

Je nach Zellphase erschienen *A-Spermatogonien* leicht bis deutlich positiv. In der Mitosephase konnte keine Z-DNS nachgewiesen werden. *In-Spermatogonien* nahmen in der Interphase an Immunreaktivität zu. Während der Mitose waren sie negativ, färbten sich aber mit Methylenblau an. Ähnliches wurde in *B-Spermatogonien* gesehen. Nach der B-Mitose (negativ) erschienen die kleinen präleptotänen *Spermatozyten I* zuerst nur schwach positiv, nahmen danach an Färbeintensität zu, so dass leptotäne und zygotäne Spermatozyten ausserordentlich stark positiv wirkten. Das

Pachytän liess sich in einen Abschnitt einteilen, worin man Z-DNS gut nachweisen konnte (Tubulusstadium XIV-II, siehe Kapitel 5.2.) und in eine Zeitspanne, in der das Kernvolumen ständig zunahm und die Z-DNS nicht mit Sicherheit mehr nachgewiesen werden konnte (III-XIII). Inwiefern die relative Dichte und das Auseinandergehen der Chromosomen zu diesem Ergebnis beitrug, bleibt noch abzuklären. Die *Spermatozyten II* und ihre Mitosefiguren zeigten keine Z-DNS-Immunreaktivität, desgleichen die *Spermatiden* sämtlicher Stadien. Die *interstitiellen mesenchymalen Zellen* waren oft, die *myoiden Zellen* teilweise positiv. *Sertoli- und Leydigzellkerne* zeigten keine Z-DNS-Reaktivität (siehe hierzu Abbildung 2e, oberes Bild, und die Details in Abbildung 3).

### Abbildung 3

Diverse Tubulusstadien mit den zugehörigen Zelltypen im Hoden des 80-tägigen Tieres.

Beschriftung: I, VII, X etc. = Tubulusstadien nach Clermont (siehe Abb. 4).

A, In, B = A-, In- und B-Spermatogonien. Pl, Le, Z, P, Di = präleptotäne, leptotäne, zygotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten I. Sp = Spermatiden. L = Leydigzellen, S = Sertolizellen, G = Arteriole mit immunpositiven Endothelzellen.

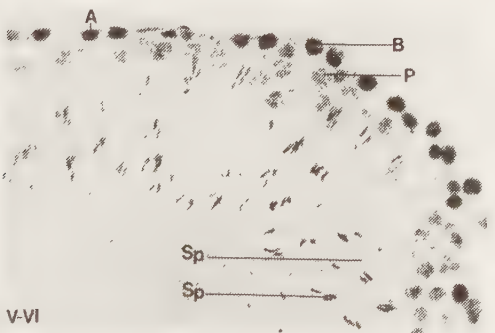
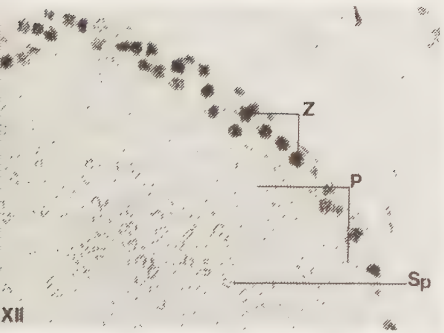
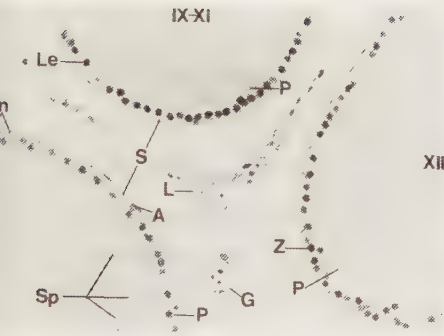
Links oben: Drei Tubuli in den Stadien II, IX-XI und XII nach Inkubation mit dem  $\alpha$ -Z(47)-Serum 1:1000. Vergrößerung x 200.

Rechts oben: Tubulusquerschnitte nach Inkubation mit dem Präimmunserum PIS 47, 1:1000 (x 55).

Links unten: Detail aus Stadium XII, inkubiert mit  $\alpha$ -Z(47) 1:1000 (die Spermatiden sind quer getroffen, x 300).

Rechts unten: Detail aus einem mit Methylenblau gegengefärbten Schnitt des Stadiums V-VI ( $\alpha$ -Z(47) 1:1000). Die dunkelsten Zellkerne stellen braun gefärbte B-Spermatogonien dar (äusserste Reihe). In der zweiten Schicht liegen pachytäne Spermatozyten, deren Grauton einer diffusen Methylenblaufärbung entspricht. In frühen Spermatiden (rund) erscheinen nur die Kernmembran und einige feine Granula hellblau, der Rest ist ungefärbt. Spätere Spermatiden (dunkel, strichförmig, gegen die Mitte des Tubulus hin) sind tiefblau gefärbt und erscheinen daher im Schwarzweissbild schwarz. Vergrößerung x 300.

Abbildung 3



## Kapitel 5

### DISKUSSION

#### **5.1    *Rekapitulation der eigenen Befunde***

Die vorliegenden Resultate erweitern vorhergehende Arbeiten über das Vorkommen von Z-DNS in Rattengewebe [54]. Die Versuche mit Rattenhoden verschiedenen Alters ergaben ein zellstadiumabhängiges Verteilungsmuster der Z-DNS-Immunreaktivität (Abb. 2 a - e, Abb. 3). In Interphasen von A-, In- und B-Spermatogonien, in präleptotänen, leptotänen, zygotänen und frühpachytänen Spermatozyten I wurde Z-DNS-Immunreaktivität gefunden, nicht dagegen in Prospermatogonien, älteren Spermatozyten I, den Spermatozyten II und den Spermatiden. Mitosefiguren waren immer negativ. Da diese Resultate nicht der Beschreibung von G. Morgenegg [54] entsprachen, nach welcher im Rattenhoden Z-DNS ausschliesslich auf Spermatogonien beschränkt war, wurden die Bilder jener Arbeit nochmals überprüft. Es stellte sich heraus, dass beim damals untersuchten 300 Tage alten Tier nicht nur Spermatogonien, sondern auch Spermatozyten I angefärbt waren. Da die Gewebserhaltung dieses Hodens aber sehr schlecht war, konnte die Stadiumsabhängigkeit der Färbung anscheinend nicht erkannt werden. Somit besteht kein Widerspruch zwischen diesen beiden Arbeiten.

## **5.2 Hodenentwicklung und Spermatogenese**

### **5.2.1 Zur Entwicklung der Gonaden bei der Ratte**

Bei der Beschreibung der Hodenentwicklung stützte ich mich auf die Literatur [23] [49] [50].

Die Gametogenese bei Säugetieren kann in drei Perioden eingeteilt werden. In der ersten, prägonadalen Etappe findet die Vermehrung und Entwicklung der Urkeimzellen statt. Die männlichen und weiblichen Gonaden sind noch nicht ausgebildet. Die zweite Phase ist charakterisiert durch eine Vermehrung und Entwicklung der Vorläufer der definitiven Keimzellen in der sich entwickelnden Gonade. Sie wird beim männlichen Individuum Präspmatogenese genannt und ist bei den Säugern erst nach der Geburt abgeschlossen. Die dritte Periode wird als Spermatogenese bezeichnet und umfasst die Reifung der Keimzellen .

Das Hodengewebe bildet sich aus Genitalleistenzellen und Urkeimzellen, die vom Dottersack her einwandern. Erst nach der Ausbildung primärer und sekundärer Keimstränge und des Reteblastems ist die Gonadenanlage geschlechtsspezifisch angelegt. Die Keimstränge bilden sich in Hodenstränge um, die sich über ihre zentralen Enden mit dem Reteblastem verbinden. Diese Hodenstränge wachsen in der Folgezeit stark in die Länge und werden nach Lumenbildung zu Samenkanälchen. Die Kanälchenbildung beginnt relativ spät, zuerst in den äusseren Abschnitten, dann sich allmählich ausbreitend nach den Tubuli recti und dem Rete testis zu. Zur Zeit der Geburt sind daher vor allem die zentralen Abschnitte vieler Kanälchen noch solid. In der gleichen Zeit ist der Hoden von seiner Lage medial der Urniere an der Nachniere vorbei nach kaudal gewandert, so dass er beider Geburt im Lei-

stenkanal aufzufinden ist. Im folgenden steigt er sukzessive in das Scrotum ab.

### **5.2.2 Zur Entwicklung der Keimzellen bei der Ratte**

Der für uns interessanteste Teil der Gametogenese ist die Präspmatogenese und die Spermatogenese. Deswegen soll darauf näher eingegangen werden (siehe auch Abbildung 5). Den folgenden Teil stellte ich aus der Literatur zusammen [12] [13] [27] [65] [66].

Die Urkeimzellen dringen zwischen dem 11. und 12. Tag nach der Konzeption (p.c.) in die Gonadenanlage ein. Zwischen dem 14. und 15. Tag p.c. vollzieht sich die sexuelle Differenzierung. In der männlichen Gonadenanlage sind vom 14.-17. Tag p.c. M-Prospermatogonien (M=multiplying) auffindbar. T1-Prospermatogonien (primary transitional) können ab dem 17. Tag p.c. gesehen werden. Auf dieser Stufe verharren die Zellen während etwa 10 Tagen und gehen dann durch Teilung in T2-Prospermatogonien über. Da die Geburt am 21. Tag erfolgt, sind die ersten T2-Prospermatogonien erst am 5. Tag nach der Geburt anzutreffen. Sie sind bis um den 9. Tag nachweisbar. Die ersten A-Spermatogonien findet man im Rattenhoden am 6. Tag nach der Geburt, am 7. Tag sind die ersten In-Spermatogonien zu sehen und am 8. Tag erste B-Spermatogonien. Diese teilen sich bald zu Spermatozyten I, welche aber spätestens im Pachytän degenerieren. Im 14 Tage alten Tier findet man darum noch einige zentrale pachytäne Spermatozyten dieses ersten Teilungsschubes. Ein zweiter, definitiver Teilungsschub der A-Spermatogonien beginnt mit 15 Tagen und leitet zum ersten kurzen spermatogenetischen Zyklus im präadulten Tier über. So sind in Tieren von 23 bis 25 Tagen die ersten Spermatozyten II sowie frischgebildete Spermatiden

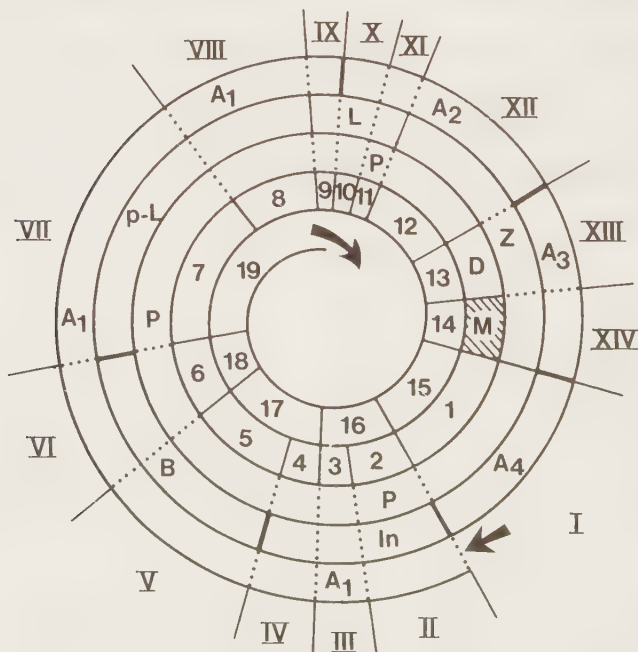
aufzufinden. Ab dem 26. Tag verläuft der spermatogenetische Zyklus geregelt und wird je nach Zuchtlinie mit durchschnittlich 12,5 Tagen angegeben. Die ersten reifen Spermien sind zwischen dem 48.-60. Tag zu finden, die ganze Spermatogenese dauert durchschnittlich 52 Tage.

Im Hoden der geschlechtsreifen Ratte verläuft die Spermatogenese streng geordnet. In einem Tubulusquerschnitt herrscht in jedem Zeitpunkt eine definierte Zellzusammensetzung, welche sich zyklisch erneuert. Gleichzeitig wandern die Zellen im Lauf ihrer Differenzierung von der Basalmembran zentralwärts gegen das Lumen (siehe Abb. 4). Diese Zellassoziationen erstrecken sich über weite Abschnitte eines Tubulus (bis 9mm). Zwei prinzipielle Klassifikationen dieser Zellansammlungen sind im Gebrauch. Die eine stammt von Curtis, Roosen-Runge und Giesel, und Ortavant, die andere von Clermont und Leblond [11]. Letztere wurde in der vorliegenden Arbeit zur Zelldifferenzierung verwendet. Sie beruht auf der Beurteilung der Akrosomen der Spermatiden, welche mit der 'Perjodsäure-Schiff'-Färbung sichtbar gemacht werden. So ergeben sich bei der Ratte 19 verschiedene Spermatidenstufen. Da aber manche Tubuli 2 Generationen von Spermatiden enthalten, reduziert sich die Zahl der diversen Zellassoziationen auf 14. Diese werden mit römischen Nummern von I - XIV bezeichnet.

Abbildung 4

Spermatogenetische "Uhr" für die Ratte nach Clermont [13]. Die mit I - XIV beschrifteten Sektoren entsprechen Zellzusammensetzungen (sogenannte Tubulusstadien), welche jeweils in einem bestimmten Tubulusabschnitt angetroffen werden. Die Grösse der Sektoren gibt die Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Zellassoziationen wieder. Die Tubulusstadien I - XIV leiten sich von den darin vorkommenden Entwicklungsstadien der Spermatiden ab (im Zentrum von 1-19 numeriert). Die Pfeilrichtung veranschaulicht den zeitlichen Ablauf der spermatogenetischen Welle in einem beliebigen Tubulusquerschnitt, und nicht die Wanderung der sich differenzierenden Zellen von der Peripherie zum Zentrum.

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, In und B: Spermatogonien der entsprechenden Typen. Die dicken Balken repräsentieren die Mitose am Uebergang von einem Typus zum anderen. p-L, L, Z, P und D: präleptotäne, leptotäne, zygotäne, pachytäne und diplotäne Spermatozyten I. M: 1. meiotische Teilung, Spermatozyten II und 2. meiotische Teilung. Arabische Zahlen: Entwicklungsstadien 1 -19 der Spermatiden.



Der spermatogenetische Zyklus beim adulten Tier geht von A-Spermatogonien aus (siehe Abb. 4). Sie bilden über 4 sich folgende A-Stadien durch gewöhnliche Mitosen entweder Intermediärspermatogonien oder wieder A-Spermatogonien, die als weitere Ausgangs-A-Zellen verbleiben. Zusätzlich sind sogenannte A0-Spermatogonien aufzufinden, welche sich nur selten teilen, aber als Reserve dienen können. Intermediärspermatogonien gehen nochmals durch eine Mitose und bilden B-Spermatogonien. Diese teilen sich zu präleptotänen Spermatozyten I. Anschliessend folgt die Meiose.

Die Meiose (Abb. 5 und 6) verläuft in den Spermatozyten I und II und umfasst die folgenden Phasen: Interphase I (auch Präleptotän genannt), Prophase I (aufgeteilt in Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakinese), Metaphase I, Anaphase I und Telophase I; dann folgen Interphase II, Prophase II, Metaphase II, Anaphase II und Telophase II. Im Präleptotän (Interphase I) wird die DNS zum tetraploiden Satz verdoppelt. Im Leptotän beginnen sich die Chromosomen zu paaren. Im Zygotän setzt sich die Paarung homologer Chromosomen fort und die Chromatiden werden stark verkürzt und spiralig aufgewunden. Lichtmikroskopisch sind sie als "Bouquetfiguren", die an einem Ort an der Kernmembran angeheftet sind, gut zu erkennen. Im Pachytän sind die Chromosomen am engsten aneinandergelagert. Hier nun geschehen Crossing overs zwischen den gepaarten Chromosomen, die später als Chiasmata (Haftstellen) die gelockerten Tetraden zusammenhalten. Das Pachytän ist die längste Periode der meiotischen Prophase I. Gegen deren Ende zu verkürzen sich die Chromatiden weiter. Im Diplotän erreicht der Zellkern seine maximale Grösse. Die Tetraden werden auseinandergezogen, trennen sich aber noch nicht völlig (Diakinese). In der Metaphase ord-

nen sie sich in der Äquatorialebene der Zelle an. Danach trennen sich die Paare vollständig und werden zu entgegengesetzten Polen der Zelle verlagert (Anaphase I). Den Abschluss der 1. Reifeteilung macht die Telophase I. Die aus dieser Teilung hervorgehenden Spermatozyten II mit diploidem DNS-Satz teilen sich nach der kurzen Interphase II, in der keine DNS-Replikation stattfindet, zu Spermatiden mit haploidem Chromosomensatz. Diese Teilung erfolgt analog zu einer Mitose über die Stadien Prophase II, Metaphase II, Anaphase II und Telophase II. Die Spermatiden formen sich innerhalb von zirka 20 Tagen in einem sehr komplexen Vorgang zu Spermien um (Details in [66]).

*Abbildung 5: Die Prä spermatogenese und Spermatogenese im Ueberblick*

*Abbildung 6: Details aus der Meiose (Spermatozyten I und II)*

Abbildung 5: PräspERMatogenese und Spermatogenese im Ueberblick

Abkürzungen: dpc = Tage nach der Konzeption (dies post conceptionem), d = Tage nach der Geburt,  
n.u. = nicht untersucht.

| Zellart              | Zeitpunkt des Auftretens | Z-DNS-<br>Vorkom-<br>men | DNS-Re-<br>kombina-<br>tion | DNS-<br>Repli-<br>kation | RNS-<br>Trans-<br>kription |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Urkeimzellen         | 11.- 12. dpc             | n.u.                     | n.u.                        | n.u.                     | n.u.                       |
| Mitose               |                          |                          |                             |                          |                            |
| M-ProspERMatogonien  | 14.- 17. dpc             | -                        | n.u.                        | +                        | n.u.                       |
| 4 Mitosen            |                          |                          |                             |                          |                            |
| T1-ProspERMatogonien | 17. dpc - 7. d           | -                        | n.u.                        | +                        | n.u.                       |
| Mitose               |                          |                          |                             |                          |                            |
| T2-ProspERMatogonien | 5.- 9. d                 | -                        | n.u.                        | +                        | n.u.                       |
| Mitose               |                          |                          |                             |                          |                            |
| A-Spermatogonien     | ab 6. d                  | +                        | -                           | +                        | +                          |
| 4 Mitosen            |                          |                          |                             |                          |                            |
| In-Spermatogonien    | ab 7. d                  | +                        | -                           | +                        | +                          |
| Mitose               |                          |                          |                             |                          |                            |
| B-Spermatogonien     | ab 8. d                  | +                        | -                           | +                        | +                          |
| Mitose               |                          |                          |                             |                          |                            |
| Spermatozyten I      | 8.- ca.16. d             | ++ bis -                 | ++ bis -                    | + bis -                  | † bis ++                   |
| 1. Reifeteilung      |                          |                          |                             |                          |                            |
| Spermatozyten II     | ab 23.- 25. d            | -                        | -                           | -                        | -                          |
| 2. Reifeteilung      |                          |                          |                             |                          |                            |
| Spermatiden 1-19     | ab 23.- 25. d            | -                        | -                           | -                        | † bis -                    |
| Reifung              |                          |                          |                             |                          |                            |
| reife Spermien       | ab 48.- 60. d            | -                        | -                           | -                        | -                          |

Abbildung 6: Details aus der Meiose

Spermatozyten I

Interphase I,

Präleptotän:



Prophase I

Leptotän:

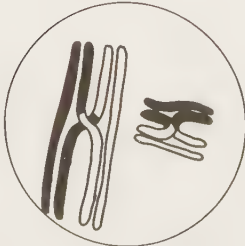


Zygotän:



Pachytän:

früh:



spät:

| Z-DNS-  | DNS-Re-  | DNS-   | RNS-     |
|---------|----------|--------|----------|
| Vorkom- | kombina- | Repli- | Trans-   |
| men     | tion     | kation | kription |

Mensch Maus

[29] [63] [30]

+ n.u. - ++ +

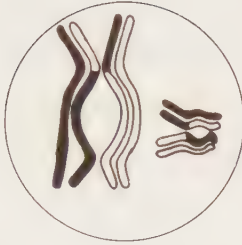
++ - + + +

+++ +++ +++ - +

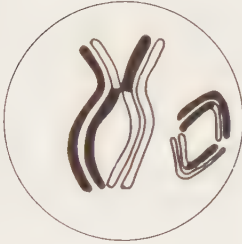
++ +++ +++ + +

- - - + +++

**Diplotän:**



**Diakinese:**



**Metaphase I**

**Anaphase I:**

**Telophase I**

*Spermatozyten II*

**Interphase II**

**Prophase II**

**Metaphase II**

**Anaphase II:**

**Telophase II und**

**Bildung von haploi-**

**den Spermatisiden**



| Z-DNS-  | DNS-Re-  | DNS-   | RNS-     |
|---------|----------|--------|----------|
| Vorkom- | kombina- | Repli- | Trans-   |
| men     | tion     | kation | kription |

|   |     |   |       |
|---|-----|---|-------|
| - | - - | - | ++    |
|   |     |   | bis + |

|   |     |   |   |
|---|-----|---|---|
| - | - - | - | - |
|---|-----|---|---|

|   |     |   |   |
|---|-----|---|---|
| - | - - | - | - |
|---|-----|---|---|

|   |     |   |   |
|---|-----|---|---|
| - | - - | - | - |
|---|-----|---|---|

### **5.3    Mögliche Funktionen von Z-DNS in der Spermatogenese**

Die biologische Funktion der Z-DNS ist immer noch unbekannt. Diskutiert werden Rollen bei RNS-Transkription, DNS-Replikation und DNS-Rekombination. Im folgenden soll versucht werden, aufgrund der Verteilung der Z-DNS-Immunreaktivität in den verschiedenen Zellstadien einen Zusammenhang zwischen Z-DNS und diesen Funktionen herzuleiten.

#### **5.3.1    RNS-Transkription**

Der Uebergang von der B- zur Z-DNS bewirkt in vitro eine erhebliche Verminderung der Transkriptionsaktivität der RNS-Polymerase von E.coli [9] [59]. Daraus wurde abgeleitet, dass Z-DNS möglicherweise ein negativer Regulator der Transkription sei. Eine Hemmung der Transkription durch Z-DNS wurde auch von Banerjee et al. [3] und Banerjee und Grunberger [4] postuliert.

Ueber die meiotische RNS-Synthese wurde in [53] und [70] berichtet. Bei der Maus zeigte Monesi [53] anhand der [<sup>3</sup>H]-Uridin-Inkorporation, dass Spermatogonien und Spermatozyten I transkriptionsaktiv sind. Die nichtnukleoläre RNS-Synthese, also die Synthese der mRNS, war gering während der präleptotänen DNS-Synthesephase und verschwindend klein während Leptotän und Zygotän. Nach dem ersten Drittel des Pachytäns stieg die Syntheserate stark an mit einem Maximum im zweiten Drittel des Pachytän. Darauf fiel sie stetig bis zur Diakinese. In den folgenden Stadien (Meta- und Anaphase I) und in den Spermatozyten II war die RNS-Synthese vollständig unterdrückt.

Beim Menschen wurden andere Verhältnisse beschrieben [70]. In A-Spermatogonien war die Transkription rein nukleolär (rRNS-Synthese), in B-Spermatogonien und Spermatozyten sowohl nukleolär als auch nichtnukleolär (mRNS-Synthese). Das Maximum der nukleolären RNS-Synthese fand sich im frühen bis mittleren Zygotän, das Maximum der nichtnukleolären RNS-Synthese vom späten Zygotän bis zum mittleren Pachytän. Die Ergebnisse bei Mensch und Maus sind also sehr verschieden.

Meine Untersuchungen über das Vorkommen von Z-DNS wurden an Ratten erhoben. Es drängt sich daher vor allem ein Vergleich mit der Maus auf. In den Rattenspermatozyten wurde die höchste Z-DNS-Immunreaktivität vom Leptotän bis ins frühe Pachytän gefunden. In dieser Zeit sistiert die chromosomale mRNS-Synthese in Mauspermatozyten. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren, die darauf hinweisen, dass Z-DNS-Strukturen die RNS-Synthese unterdrücken.

### **5.3.2 DNS-Replikation**

Die Z-Form von DNS ist *in vitro* ein starker Inhibitor der DNS-Polymerase I von *E. coli* und der DNS-Polymerase des Avian Myeloblastosis Virus [7] [62]. Ein Zusammenhang zwischen Z-DNS und Replikationsaktivität wurde auch von Staiano-Coico et al. [68] gesucht. Diese Autoren wiesen Z-DNS-Immunreaktivität in verschiedenen Zellzyklusphasen von Lymphozyten nach und zeigten, dass nach dem Eintritt in die S-Phase die Immunreaktivität gegen Z-DNS kontinuierlich abnahm.

In den Keimzellen findet die DNS-Replikation nur bis zum Leptotän statt (siehe Abb. 5 und 6). Bis zum Pachytän ist noch eine sehr beschränkte DNS-Synthese nachweisbar. Diese steht im Zusammenhang mit Chromosomen-

paarungen und Crossing overs [53] [66]. In späteren Stadien sistiert die DNS-Synthese vollständig.

Aufgrund meiner Befunde lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Z-DNS und der DNS-Replikation in den Keimzellen erkennen.

### **5.3.3 DNS-Rekombination**

Folgende Untersuchungen aus der Literatur machen einen Zusammenhang zwischen Z-DNS und DNS-Rekombination wahrscheinlich:

1. Das Rec 1-Protein des Pilzes *Ustilago maydis* katalysiert die Rekombination homologer DNS-Abschnitte. Es bindet stärker an Z-DNS als an B-DNS. Das Zusammentreffen dieser beiden Eigenschaften liess vermuten, dass bei der Formung von Tetraden im Bereich der Kontaktstelle zwischen homologen Chromosomen eine Z-DNS-Struktur entsteht. Die Paarungsreaktion wurde durch spezifische Antikörper gegen Z-DNS gehemmt [35] [36].
2. Bei *Escherichia coli* ist ein analoges Rekombinationsprotein bekannt, das als Rec A-Protein bezeichnet wird. Es bindet Z-DNS ebenfalls bevorzugt gegenüber B-DNS [6].
3. In einem bakteriellen Plasmid finden homologe Rekombinationen bevorzugt in der Nachbarschaft von potentiell Z-DNS-bildenden Sequenzen statt [55].

Meine Untersuchungen zeigten das Vorkommen von Z-DNS-Immunreaktivität in Spermatogonien und Spermatozyten I (siehe Abb. 5 und 6). Die intensivste Immunfärbung fand sich im Leptotän, Zygotän und frühen Pachytän. Die Rekombination findet bei Mensch und Maus hauptsächlich im Zygotän und frühen Pachytän statt [63] [29] [30]. Es ist anzunehmen, dass dies auch bei der Ratte der Fall ist. Die auffallend gute Korrelation zwischen

der Intensität der Z-DNS-Immunreaktivität und der Rekombinationsaktivität unterstützt die Vermutung, dass Z-DNS bei der homologen Rekombination in der Meiose eine wichtige Rolle spielt. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass aus dem Hoden des Stieres kürzlich drei hochaffine Z-DNS-bindende Proteine isoliert wurden [16]. Gegenwärtig wird untersucht, ob diese in vitro die homologe Rekombination katalysieren.

## **Kapitel 6**

### **ZUSAMMENFASSUNG**

Im Hoden von Ratten verschiedenen Alters (-3, 2, 7, 14, 21, 29 und 80 Tage) wurde mittels Immunhistochemie Z-DNS nachgewiesen. Es wurde ein Z-DNS-spezifisches polyklonales Antiserum verwendet. Die Spezifität der Immunreaktion wurde durch Absorptionsversuche mit Z- und B-DNS bestätigt. Die Färbung erfolgte ausschliesslich in den Zellkernen. Z-DNS-Antigenität besaßen A-, In- und B-Spermatogonien in der Interphase sowie Spermatozyten I im Präleptotän, Leptotän, Zygotän und frühen Pachytän. Sertolizellen färbten sich in den Tieren im Alter von 7 bis 21 Tagen, myoide Zellen und interstitielle mesenchymale Zellen reagierten in den jüngeren Tieren stärker als in den Adulten. Die höchste Z-DNS-Immunreaktivität wurde in den Spermatozyten I beobachtet, insbesondere im Leptotän, Zygotän und im frühen Pachytän. In diesen Stadien finden auch die meiotischen Rekombinationen statt. Diese Korrelation liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass Z-DNS in der homologen Rekombination eine wichtige Rolle spielen könnte.

## Kapitel 7

### LITERATURVERZEICHNIS

1. Aiken J.M., Miller F.D., Hagen F., McKenzie D.I., Krawetz S.A., Van de Sande J.H., Rattner J.B. & Dixon H.G. (1985)  
Tandem repeats of a specific alternating purine-pyrimidine DNA sequence adjacent to protamine genes in the rainbow trout that can exist in the Z-form  
*Biochemistry* 24, 6268-6276
2. Azorin F. & Rich A. (1985)  
Isolation of Z-DNA binding proteins from SV 40 minichromosomes: Evidence for binding to the viral control region  
*Cell* 41, 365-374
3. Banerjee R., Carothers A.M. & Grunberger D. (1985)  
Inhibition of the herpes simplex virus thymidine kinase gene transfection in Ltk<sup>-</sup>-cells by potential Z-DNA forming polymers  
*Nucleic Acids Res.* 13, 5111
4. Banerjee R. & Grunberger D. (1986)  
Enhanced expression of the bacterial chloramphenicol acetyltransferase gene in mouse cells cotransfected with synthetic polynucleotides able to form Z-DNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4988-4992

5. Benevides J.M., Wang A.H., van der Marel G.A., van Boom J.H., Rich A. & Thomas G.J. (1984)  
The Raman spectra of left-handed DNA-oligomers incorporating adenine-thymine base pairs  
*Nucleic Acids Res.* 12, 5913-5925
6. Blaho J.A. & Wells R.D. (1987)  
Left-handed Z-DNA binding by the Rec A protein of *E. coli*  
*J. Biol. Chem.* 262, 6082-6088
7. Brahmachari S.H., Ramesh N., Das M.R. & Parnaik V.K. (1985)  
Poly(dG-dC) in the Z-Form inhibits *E. coli* DNA polymerase I and AMV DNA polymerase activity  
*Biochem. Int.* 11, 281-290
8. Burck H-C. (1982)  
Histologische Technik  
*Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York, 5. Auflage*
9. Butzow J.J., Shin Y.A. & Eichhorn G.L. (1984)  
Effect of template conversion from the B- to the Z-conformation on RNA polymerase activity  
*Biochemistry* 23, 4837-4843

10. DiCapua E., Stasiak A., Koller T., Brahms S., Thomae R. & Pohl F.M. (1983)  
Torsional stress induces left-handed helical stretches in DNA of natural base sequence: circular dichroism and antibody binding  
*EMBO J. 2, 1531-1535*
11. Clermont Y. & Leblond C.P. (1955)  
Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid-Schiff" technique  
*Amer. J. Anat. 96, 229-253*
12. Clermont Y. & Perey B. (1957)  
Quantitative study of the cell population of seminiferous tubules in immature rats  
*Amer. J. Anat. 100, 241-267*
13. Clermont Y. (1972)  
Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal  
*Physiol. Rev. 52, 198-236*
14. Crawford J.L., Kolpak F.J., Wang A.H.-J., Quigley G.J., van Boom J.H., van der Marel G. & Rich A. (1980)  
The tetramer d(CpGpCpG) crystallizes as a left-handed double helix  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4016-4020*

15. Farlane D.Mc., Farrance I., Hall J., Morris J. & Ivorie R.  
The rat prolactin gene contains at least six poly(dT-dG) • poly(dC-dA)  
repeats  
*Nucleic Acids Res.* 14, 7805-7806
16. Gut S.H., Bischoff M., Hobi R. & Kuenzle C.C. (1987)  
Z-DNA binding proteins from bull testis  
*Nucleic Acids Res.* 15, 9691-9705
17. Hadorn E. & Wehner R. (1978)  
Allgemeine Zoologie  
*Georg Thieme Verlag Stuttgart/New York*
18. Hamada H. & Kakunaga T. (1982)  
Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the  
human genome  
*Nature (London)* 298, 396-398
19. Hamada H., Petrino M.G. & Kakunaga T. (1982)  
A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely  
found in evolutionary diverse eucariotic genomes  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6465-6469

20. Hamada H., Petrino M.G., Kakunaga T., Seidman M & Stollar B.D. (1984)  
Characterisation of genomic poly(dT-dG) • poly(dC-dA) sequences:  
structure, organisation and conformation  
*Mol. Cell. Biol.* 4, 2610-2621
21. Hamada H., Seidman M., Howard B. & Gorman C.M. (1984)  
Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) • poly(dC-dA) sequence  
*Mol. Cell. Biol.* 4, 622-2630
22. Hayes T.E. & Dixon J.E. (1985)  
Z-DNA in the rat somatostatin gene  
*J. Biol. Chem.* 260, 8145-8156
23. Hebel R. & Stromberg M.W. (1976)  
Anatomy and embryology of the laboratory rat  
*Bio Med Verlag, Wörthsee*
24. Hill R.J. & Stollar B.D. (1983)  
Dependence of Z-DNA antibody binding to polytene chromosomes on  
acid fixation and torsional strain  
*Nature (London)* 305, 338-340
25. Hill R.J. (1984)  
On the status of the Z-DNA question for animal chromosomes  
*Bioessays* 1, 244-249

26. Hilscher W. (1967)  
DNA synthesis; proliferation and regeneration of the spermatogonia in  
the rat  
*Arch. Anat. Micr.* 56, 75-84
27. Hilscher W. & Hilscher B. (1976)  
Kinetics of the male gametogenesis  
*Andrologia* 8, 105-116
28. Hoheisel J. & Pohl F. (1987)  
Searching for potential Z-DNA in genomic E. coli DNA  
*J. Mol. Biol.* 193, 447-464
29. Holm P.B. & Rasmussen S.W. (1983)  
Human meiosis VI: Crossing over in human spermatocytes  
*Carlsberg Res. Commun.* 48, 385-413
30. Hotta Y., Tabata S., Bouchard R., Pinon R. & Stern H. (1985)  
General recombination mechanisms in extracts of meiotic cells  
*Chromosoma (Berlin)* 93, 140-151
31. Huckins C. (1963)  
Changes in gonocytes at the time of initiation of spermatogenesis in  
the rat  
*Anat. Rec.* 145, 243

32. Jagiello G.M., Mesa-Tejada R., Ducayen M.B., Fang J.-S., Khatcherian A.O., Kuenzle C.C. & Bowe W. (1988)  
The immunocytochemical localisation of Z-DNA in human testicular epithelium  
*Biol. Reprod., im Druck*
33. Arndt-Jovin D.J., Robert-Nicoud M., Zarling D.A., Greider C., Weimer E. & Jovin T.M. (1983)  
Left-handed Z-DNA in bands of acid fixed polytene chromosomes  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4344-4348*
34. Arndt-Jovin D.L., Robert-Nicoud M., Baurschmidt P. & Jovin T.M. (1985)  
Immunofluorescence localisation of Z-DNA in chromosomes: quantitation by scanning microphotometry and computer-assisted image analysis  
*J. Cell Biol. 101, 1422-1433*
35. Kmiec E.B., Angelides K.J. & Holloman W.K. (1985)  
Left-handed DNA and the synaptic pairing reaction promoted by *Ustilago rec 1* protein  
*Cell 40, 139-145*
36. Kmiec E.B. & Holloman W.K. (1986)  
Homologous pairing of DNA molecules by *Ustilago rec 1* protein is promoted by sequences of Z-DNA  
*Cell 44, 545-554*

37. Lafer E.M., Möller A., Nordheim A., Stollar B.D. & Rich A. (1981)  
Antibodies specific for left-handed Z-DNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3546-3550
38. Lafer E.M., Möller A., Valle R.C., Nordheim A., Rich A. & Stollar B.D.  
(1982)  
Antibody recognition of Z-DNA  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47, 155-162
39. Lafer E.M., Sousa R. & Rich A. (1985)  
Anti-Z-DNA antibody binding can stabilize Z-DNA in relaxed and linear  
plasmids under physiological conditions  
*EMBO J.* 4, 3655-3660
40. Lancilotti F., Lopez M.C., Alonso C. & Stollar B.D. (1985)  
Locations of Z-DNA in polytene chromosomes  
*J. Cell Biol.* 100, 1759-1766
41. Lancilotti F., Lopez M.C., Arias P. & Alonso C. (1987)  
Z-DNA in transcriptionally active chromosomes  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1560-1564
42. Lemeunier F., Derbin C., Malfoy B., Leng M. & Taillandier E. (1982)  
Identification of left-handed Z-DNA by indirect immunofluorescence in  
polytene chromosomes of *Chironomus thummi thummi*  
*Exp. Cell Res.* 141, 508-513

43. Leng M. (1985)  
Left-handed Z-DNA  
*Biochem. Biophys. Acta* 825, 339-344
44. Lipps H.J., Nordheim A., Lafer E.M., Ammermann D., Stollar B.D. & Rich A. (1983)  
Antibodies against Z-DNA react with the macronucleus but not the micronucleus of the hypotrichous ciliate *Stylonychia mytilus*  
*Cell* 32, 435-441
45. Malfoy B. & Leng M. (1981)  
Antiserum to Z-DNA  
*FEBS Letters* 132, 45-48
46. Malfoy B., Rousseau N. & Leng M. (1982)  
Interaction between antibodies to Z-form deoxyribonucleic acid and double-stranded polynucleotides  
*Biochemistry* 21, 5463-5467
47. Marx J.L. (1985)  
Z-DNA: still searching for a function  
*Science* 230, 794-796

48. Mesa-Tejada R. (1985)  
Immunocytochemistry for the selection of hybridomas and the characterisation of monoclonal antibodies: Problems, solutions and suggestions  
*In: Ceriani R. (ed). Monoclonal antibodies and breast cancer, Martinus Nijhoff Publishing, Seite 119-133*
49. Michel G. (1977)  
Kompendium der Embryologie der Haustiere  
*Gustav Fischer Verlag Stuttgart New York, 2. Auflage*
50. Mintz B. (1960)  
Symposium on mammalian genetics and reproduction: Embryological phases of mammalian gametogenesis  
*J. Cell Comp. Physiol. 56, 31-48*
51. Möller A., Gabriels J.E., Nordheim A., Rich A. & Stollar B.D. (1982)  
Monoclonal antibodies recognize different parts of Z-DNA  
*J. Biol. Chem. 257, 12081-12085*
52. Möller A., Nordheim A. & Rich A. (1984)  
Bromination stabilizes poly(dG-dC) in the Z-DNA form under low salt conditions  
*Biochemistry 23, 54-62*

53. Monesi V. (1971)  
Chromosome activities during meiosis and spermiogenesis  
*J. Reprod. Fert., Suppl. 13, 1-14*
54. Morgenegg Gottfried (1983)  
Immunhistochemischer Nachweis von Z-DNS in Rattengeweben  
*Dissertation an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich*
55. Murphy K.E. & Stringer J.R. (1986)  
RecA independent recombination of poly[d(GT)-d(CA)] in pBR 322  
*Nucleic Acids Res. 14, 7325-7340*
56. Nordheim A., Pardue M.L., Lafer E.M., Möller A., Stollar B.D. & Rich A. (1981)  
Antibodies to left-handed Z-DNA bind to interbands of Drosophila polytene chromosomes  
*Nature (London) 294, 417-422*
57. Nordheim A., Pardue M.L., Weiner L.M., Löwenhaupt K., Scholten P., Möller A., Rich A. & Stollar B.D. (1986)  
Analysis of Z-DNA in fixed polytene chromosomes with monoclonal antibodies that show base sequence-dependent selectivity in reactions with supercoiled plasmids and polynucleotides  
*J. Biol. Chem. 261, 468-476*

58. Oakberg E.F. (1971)  
Spermatogonial stem cell renewal in the mouse  
*Anat. Rec.* 169, 515-532
59. Peck L.J. & Wang J.C. (1985)  
Transcriptional block caused by a negative supercoiling induced structural change in an alternating C-G sequence  
*Cell* 40, 129-137
60. Pohl F.M. & Jovin T.M. (1972)  
Salt-induced cooperative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC) • poly(dG-dC)  
*J. Mol. Biol.* 67, 375-396
61. Pohl F.M. (1986)  
Dynamics of the B- to Z-transition in supercoiled DNA  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4983-4987
62. Ramesh N., Shouche Y.S. & Brahmachari S.K. (1986)  
Recognition of B- and Z-forms of DNA by E. coli DNA polymerase I  
*J. Mol. Biol.* 190, 635-638
63. Rasmussen S.W. & Holm P.B. (1978)  
Human meiosis II: chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes  
*Carlsberg Res. Commun.* 43, 275-327

64. Rich A., Nordheim A. & Wang A.H.J. (1984)  
The chemistry and biology of left-handed Z-DNA  
*Ann. Rev. Biochem.* 53, 791-846
65. Roosen-Runge E.C. (1962)  
The process of spermatogenesis in mammals  
*Biol. Rev.* 37, 343-377
66. Setchell B.P. (1978)  
The mammalian testis  
*Cornell Univ. Press, Ithaca, New York*
67. Söderström K.O. & Parvinen M. (1978)  
Observations on living rat spermatogenic cells in different developmental stages  
*Acta anatomica* 100, 557-572
68. Staiano-Coico L., Stollar B.D., Darzynkiewicz Z., Dutkowski R. & Weksler M.E. (1985)  
Binding of anti-Z-DNA antibodies in quiescent and activated lymphocytes: relationship to cell cycle progression  
*Mol. Cell. Biol.* 5, 3270-3273
69. Sternberger L.A. (1979)  
Immunocytochemistry  
*Wiley and sons New York, 2. Auflage*

70. Tres L.L. & Kierszenbaum A.L. (1977)  
Premeiotic and meiotic prophase synthesis in human testes. In: The testis in normal and infertile men  
*Troen P. & Nanhip H.R. (ed), Raven Press, New York, Seite 9-23*
71. Trifonov E.N., Konopha A. & Jovin T. (1985)  
Unusual frequencies of certain alternating purine-pyrimidine runs in natural DNA-sequences: relation to Z-DNA  
*FEBS Letters 185, 197-202*
72. Viegas E., Derbin C., Malfoy B., Taillandier E. Leng M. & Dutrillaux B. (1983)  
Z-DNA immunoreactivity in fixed metaphase chromosomes of primates  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5890-5894*
73. Wang A.H.J., Quigley G.J., Kolpak F.J., Crawford J.L., van Boom J.H., van der Marel G. & Rich A. (1979)  
Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution  
*Nature (London) 282, 680-686*
74. Watson J.D. & Crick F.H.C. (1953)  
Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid  
*Nature (London) 171, 737*

## **Kapitel 8**

### **DANKESADRESSEN**

Bei folgenden Damen und Herren möchte ich mich ganz herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. C. C. Kuenzle für die Anleitung und Diskussion der Arbeit,  
für das Durchsehen des Manuskriptes und  
das Referat

Herrn Prof. Dr. E. Jenny für das Korreferat

Herrn Dr. R. Hobi für die freundschaftliche Betreuung und Beratung

Herrn Prof. Dr. M. Celio und Dr. G. Morgenegg für die Einführung in die Im-  
munhistochemie und das Dissertationsthema

Herrn Dr. R. Marugg für die Ueberlassung eines Arbeitsplatzes in seinem  
Labor

Herrn Dr. M. Leng für die Charakterisierung des Antiserums

Frau A. Hug und Frau H. Weber für die fotografischen Arbeiten

Meinem Verlobten Th. Leu für die praktischen Ratschläge und die  
persönliche Unterstützung

Das Projekt wurde unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds, Kredit  
Nr. 3.321-0.86.

## **Kapitel 9**

### **LEBENS LAUF**

Daniela Dorith Naegeli, geboren am 8. Februar 1962 in Zürich, Bürgerin von Zürich und Marthalen (ZH).

1968 - 1974 : Primarschule in Madetswil und Bäretswil

1974 - 1981 : Kantonsschule in Wetzikon ZH

1981 : Matura Typus B

1981 - 1986 : Studium der Veterinärmedizin in Zürich

1986 : Staatsexamen als Tierärztin in Zürich

1983 - 1988 : Während des Studiums und anschliessend an das  
Staatsexamen Arbeit am Dissertationsthema am  
Institut für Pharmakologie und Biochemie der  
Veterinärmedizinischen Fakultät Zürich







